3.-2.-2.　FLAG融合タンパク質の発現誘導（大腸菌、哺乳類、昆虫）

b) 哺乳類

ベクター構築が済んだプラスミドは、ラージスケールのプラスミド抽出キット等を用いて精製して下さい。対象サンプルがエンドトキシン感受性が高い場合は、弊社のGenElute Endotoxin Freeプラスミド抽出キットシリーズを用いてプラスミド精製を行って下さい。哺乳類細胞へのDNA（プラスミド）トランスフェクション法については、多くのプロトコル集が出版されておりますが、今回は、弊社のトランスフェクション試薬ESCOTEシリーズを用いた方法についてご紹介いたします。また、弊社以外のメーカーより多くのトランスフェクション試薬が販売されており、方法はそれぞれの取扱説明書を参考に従って下さい。

トランスフェクション（6 well plateを用いた場合）

必要な試薬類

・ESCORT V Transfection Reagent
・ESCORT V Transfection Buffer

1. 細胞の用意

付着細胞の場合

トランスフェクションの18-24時間前に、2x104 cells/ cm2の密度で細胞をプレーティングし、37℃で一晩培養して下さい。
トランスフェクション　カクテルを加える前、30分～2時間前に2.5 mlの新鮮な生育培地で培地交換して下さい。

浮遊細胞の場合

トランスフェクション前に、細胞を集め、0.5-1x106 cells/mlとなる様に新鮮な生育培地に懸濁して下さい。
2.5 mlの懸濁細胞をwellに撒いて下さい。

2. トランスフェクション

最初にプラスミドDNA：ESCORT Vtransfection reagent比が、1：3となる条件でトランスフェクションを行って下さい。
この比を変えてトランスフェクションを行う場合でも、ESCORT V Transfection Buffer量300µlは変えないで下さい。
滅菌チューブに300µlのESCORT V Transfection Bufferと3.5µgのDNAを加え、ゆっくり混ぜて下さい。
他のチューブを用意し、300µlのESCORT V Transfection Bufferと10.5µlのESCORT V Transfection Reagentを加え、ゆっくり混ぜて下さい。
プラスミドDNA/バッファー液とESCORT V reagent/バッファー液をゆっくり混ぜ、15-20分間室温に静置して下さい。
これをトランスフェクションカクテルとします。
全量のトランスフェクションカクテルをwellに添加し、プレートをゆっくり振とうして下さい。
24～72時間、スタンダードな条件下で培養して下さい。

トランジェント（一過性発現）の場合

トランスフェクション後、FLAG抗体を用いた継時的な免疫染色、または継時的にサンプリングしタンパク発現量をウエスタンブロッティング法により発現に最適な培養時間を決定して下さい。

ステイブル（安定発現）の場合

トランスフェクション2日後に、G418（ジェネティシン）を含む新鮮な培地で培地交換を行い、4日間毎に培地交換を行って下さい。
G418の最適濃度は、前試験として細胞種毎に決定して下さい。

3. FLAG融合タンパク質の発現確認

細胞内に、トランスフェクトしたFLAG融合タンパク質が発現したかどうかの確認は、ウエスタンブロットなどで行って下さい。

© 2009 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.